



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsa

Nya metoder för att detektera AhR-aktivitet i fiskceller

Linnea Eknefelt

*Uppsala
2018*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2018:23*

Nya metoder för att detektera AhR-aktivitet i fiskceller

New methods to detect AhR activity in fish cells

Linnea Eknefelt

Handledare: Johan Lundqvist, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Sebastian Lungu-Mitea och Anna Rosenmai, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Agneta Oskarsson, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0830

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Delnummer i serie: Examensarbete 2018:23

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: arylhydrokarbonreceptor, AhR, akvatisk toxicitet, zebrafiskceller, ZFL, ZF4, TCDD, luciferas

Key words: aryl hydrocarbon receptor, AhR, aquatic toxicity, zebrafish cells, ZFL, ZF4, TCDD, luciferase

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

SAMMANFATTNING

Toxicitetstester på bland annat fisk är ett viktigt verktyg för att samla kunskap om kemikaliers effekter i akvatiska miljöer. Samtidigt finns det flera anledningar att försöka minimera antalet tester på levande djur; till exempel ekonomiska, praktiska och inte minst djuretiska skäl. Ett alternativ till dessa ekotoxikologiska djurförsök är användning av cellbaserade metoder *in vitro*. Odlade cellinjer från olika arter har använts inom forskningen i flera årtionden, däribland toxikologiska studier. I denna studie gjordes en serie försök med syftet att utforma en metod för mätning av aktivering av arylhydrokarbonreceptorn (AhR) i zebrafiskceller, som mått på toxisk påverkan. Det gjordes genom att cellerna transfekterades med en plasmid innehållande ett AhR-känsligt element som vid aktivering av Ah-receptorn inducerar transkription av luciferas, vars kvantitet sedan kunde mätas som luminiscens och på så vis fås ett mått på AhR-aktiveringen. Även generell celltoxicitet mättes i parallella försök. Resultaten visade att TCDD och benzo(a)pyrene aktiverar AhR i varierande grad beroende på koncentration och cellinje (ZFL eller ZF4). B-naftoflavone gav endast aktivering i högsta koncentrationen som användes, 62,2 nM, hos ZFL, och ingen tydlig aktivering alls i valda koncentrationer hos ZF4. Dessutom gjordes försök med olika plasmidförhållanden, celldensiteter och användning av serumfritt medium för att försöka optimera metoden och göra den känsligare. Små förändringar kunde ses i dessa försök, som bör tas hänsyn till i utförandet. Dock skulle fler upprepningar behöva göras för säkrare resultat. Som bäst sågs en fold induction avseende reporteraktiviteten (AhR-aktivering → luciferas → luminiscens) på ca 12 för ZFL och 8 för ZF4 i de högsta koncentrationerna som användes. Den lägsta koncentrationen som gav en signifikant ökad reporteraktivitet var 1 nM hos ZF4 och 0,34 nM hos ZFL.

SUMMARY

Toxicity tests on fish, among others, is an important tool to gather information on the effects of chemicals in aquatic environments. At the same time there are several reasons to try to minimize the number of *in vivo* animal tests; for example economical, practical and not least ethical reasons. One alternative to these ecotoxicological animal tests is the use of cell based methods *in vitro*. Cultured cell lines from different species have been used in research for decades, among them toxicological studies. In this study a series of experiments were conducted in order to design a method to measure activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in zebrafish cells, as a measure of toxic effect. This was done by transfecting the cells with a plasmid containing an AhR sensitive element which in response to activation of the Ah-receptor induce transcription of luciferase, after which the quantity can be measured as luminescence and thereby provide a measure of the AhR-activation. General cell toxicity was also measured in parallel experiments. The results show that TCDD and benzo(a)pyrene activates AhR in varying degree, depending on concentration and cell line (ZFL or ZF4). B-naftoflavone only activated AhR in the highest concentration used, 62,2 nM, in ZFL, and no activation at all in ZF4, in the chosen concentrations. In addition, experiments were performed using different plasmid ratios, cell densities and serum free medium with the aim to optimize the method and increase its sensitivity. Some small variations were observed in these experiments, which should be taken in consideration. However, optimally these should be repeated to improve the reliability of the results. At most, there was a fold induction of the reporter activity (AhR activation → luciferase → luminescence) of roughly 12 in ZFL and 8 in ZF4 in the highest concentrations used. The lowest concentration resulting in significant increase in reporter activity was 1 nM in ZF4 and 0,34 nM in ZFL.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Inledning.....	1
Syfte	1
Litteraturoversikt.....	2
Akvatisk toxicitetstestning och <i>in vitro</i> -metoder som alternativ till <i>in vivo</i>	2
Adverse outcome pathway och toxicity pathways	2
Arylhydrokarbonreceptorn	3
Zebrafiskceller.....	3
Material och metoder.....	5
Cellodling	5
Kemikalier.....	5
Luciferase reporter assay	5
Cellviabilitet	6
Statistisk analys	6
Resultat.....	7
TCDD – reporteraktivitet och viabilitet	7
Plasmid-ratios.....	8
Celldensitet.....	9
Benzo(a)pyrene och B-naftoflavone	10
Serumfritt medium	12
Diskussion	13
Referenser.....	16

INLEDNING

Hela tiden tillkommer nya kemikalier som vi kan komma i kontakt med – på grund av nya upptäckter, metoder för framställning, nya användningsområden et cetera. Många av dessa ämnen kan vara till stor nytta för oss, men vissa riskerar även att skada vår hälsa eller ha negativa effekter i naturen. Det är därför viktigt att vi skaffar oss en gedigen kunskap om de kemikalier som vi människor och djur exponeras för, eller som riskerar att släppas ut i miljön. Vattenlevande organismer är särskilt utsatta då mycket avfall till slut når vattendragen. Europeisk lagstiftning kräver att ett stort antal kemiska substanser ska genomgå testning för akvatisk toxicitet, en testning som ofta omfattar djurförsök. Under 2011 användes mer än 1,4 miljoner kallblodiga djur, däribland fiskar, i djurförsök i EU (Europeiska kommissionen, 2013). Målet med detta projekt var att utveckla en metod för djurfri testning av fisktoxicitet, grundat på principen om toxicity pathways. Det innebär att man tack vare kunskapen om mekanismerna på cellnivå som förmedlar den toxiska effekten av kroppsfrämmande ämnen, skulle kunna använda *in vitro* metoder baserade på odlade celler som substitut till vissa tester på levande djur. Genom att undersöka den akvatiska toxiciteten med hjälp av metoder som grundas på toxicity pathways och celler som odlas i laboratoriet, skulle man kunna analysera toxiciteten för ett stort antal kemikalier på ett snabbt och kostnadseffektivt sätt och samtidigt minska användningen av försöksdjur.

Syfte

Syftet med projektet var att etablera en cellbaserad metod för att mäta aktivering av arylhydrokarbonreceptorn (AhR) i zebrafiskceller.

LITTERATURÖVERSIKT

Akvatisk toxicitetstestning och *in vitro*-metoder som alternativ till *in vivo*

De flesta industrialiserade länderna har, i varierande omfattning, lagstiftning som kräver ekotoxikologiska studier på fiskar, av bland annat bekämpningsmedel, industriella kemikalier och läkemedel. Dessa tester inkluderar akut och kronisk toxicitet, effekter på olika utvecklingsstadium, reproduktion och biokoncentration (OECD Environment Directorate, 2012). Vanligtvis genomförs tester på både växter, ryggradslösa djur (t ex *Daphnia* spp) och ryggradsdjur (t ex fisk) (Europeiska kommissionen, 2014).

Europeiska unionens referenslaboratorium för alternativ till djurförsök (EURL ECVAM) skriver i sin rapport från 2014 att vi bör sträva efter att minska användningen av försöksdjur markant (Europeiska kommissionen, 2014). Detta är även i linje med EU:s direktiv för skydd av försöksdjur, där man manar till "replacement, reduction och refinement" (ersättning, begränsning och förfining) av djurförsök, bland annat genom att använda *in vitro*-metoder istället (Europaparlamentet och rådet, 2010). Artikel 4, punkt 1 lyder: "Medlemsstaterna ska säkerställa att en vetenskapligt tillfredsställande metod eller teststrategi, som inte innebär användning av levande djur, ska användas i stället för ett försök när så är möjligt." EURL ECVAM (2014) vill bland annat utforska möjligheterna att använda fiskcellinjer som en del i arbetet för att minska djurförsöken, och bedömer att det kan bli en godkänd metod för test av akut toxicitet inom 3-5 år.

Fiskcellinjer etablerades redan i början av 60-talet (Wolf & Quimby, 1962) men det var först på 80-talet som fiskceller blev en mer erkänd metod för toxicitetsstudier (Castano *et al.*, 2003). Fördelarna med cellinjer istället för *in vivo*-tester, utöver den etiska aspekten, är bland annat att man kan studera effekter på cellulär och molekylär nivå i en kontrollerad miljö utan inblandning av andra fysiologiska system. Det är även ett relativt billigt och snabbt sätt att testa toxiciteten för ett stort antal kemikalier, sk high-throughput. (Castano *et al.*, 2003). Dock finns det potentiella felkällor som kan påverka resultaten vid användning av odlade celler som man bör känna till och ta hänsyn till. Miljöfaktorer, hantering och medium kan påverka utfallet. Till exempel kan biotillgängligheten av kemikalien av intresse minska genom att den binds till serumet i mediet eller till plasten i plattorna (Schirmer, 2006).

Adverse outcome pathway och toxicity pathways

Begreppet adverse outcome pathway (AOP) är ett koncept där man utnyttjar kunskapen om hur en viss molekylärbiologisk händelse är kopplad till en negativ biologisk effekt. Detta kan användas för riskbedömning inom toxikologi och ekologi. En sådan händelse kan till exempel vara interaktionen mellan en xenobiotisk substans och en specifik biomolekyl, som leder till toxiska effekter hos organismen. AOP:s kan således användas för att förutspå kemikaliers påverkan på individer och populationer – om det är känt att en substans initierar en viss signalväg, och det sedan tidigare är känt att den signalvägen leder till sjukdom hos organismen, kan man anta att denna substans kommer att öka risken för samma sjukdom. Toxicity pathway är ett snarlikt begrepp och definieras som en signalväg på cellnivå som resulterar i negativa hälsoeffekter. Skillnaden är att AOP inkluderar ett antal olika steg som går hela vägen från initieringen på molekylnivå, till den negativa effekten för organismen som är relevant för riskbedömning (Ankley *et al.*, 2010). Det är dessa kända signalvägar som möjliggör studier att

toxicitet på enskilda celler istället för hela organismer, förutsatt att det finns tillräckligt med kunskap om dem och vad dess aktivering har för betydelse för den levande individen.

Arylhydrokarbonreceptorn

Ett exempel på AOP/toxicity pathway involverar arylhydrokarbonreceptorn (AhR). AhR är den viktigaste inducerbara signalvägen för biotransformation av organiska molekyler. AhR kan aktiveras av en mängd olika hydrofoba aromatiska substanser, däribland halogenerade aromatiska kolväten (HAH), polycykliska aromatiska kolväten (PAH), aromatiska aminer, rutaecarpine alkaloider, indolocarbazoler och andra liknande substanser. Ingen endogen ligand för receptorn har identifierats (Hankinson, 1995). AhR kallas ibland även för dioxin-receptorn eller TCDD-receptorn. TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) är en mycket potent ligand till receptorn.

Kemikalier som binder till AhR kan ha toxisk effekt i sig, men även indirekt via AhR-signalvägen. När AhR aktiveras induceras enzymer som kan leda till toxicitet, såsom cancer, reproduktionsstörningar, immunodepression och "early-life-stage" mortalitet (Poland & Knutson, 1982, Peterson *et al.*, 1993). Det har visats att de toxiska effekterna av TCDD initieras via AhR, genom att möss vars AhR har slagits ut har blivit resistenta mot TCDD-toxicitet (Fernandez-Salguero *et al.*, 1996). Även zebrafiskembryon med hämmad AhR-translation hade minskad och fördröjd TCDD-toxicitet (Prasch *et al.*, 2003).

Signalvägen inleds med att en molekyl binder till Ah-receptorn. I fritt tillstånd är AhR kopplad till heat shock protein 90 (HSP90) men vid bindning med liganden fosforyleras komplexet AhR/ligand och transporteras in till cellkärnan. AhR-komplexet binder in till DNA och inducerar gentranskription av målgenen. Det är framförallt cytokrom P450 (CYP) 1A1 som produceras till följd av den AhR-inducerade gentranskriptionen, men även andra fas I och II-enzym (Nikinmaa, 2014). Det är känt att flera av CYP-enzymerna kan metabolisera procarcinogener till carcinogener, och på så vis ökar risken för cancer vid långvarig exponering av substanser som leder till en inducering av dessa (Shimada *et al.*, 1996). Mycket tyder på att även själva aktiveringen av Ah-receptorn kan leda till toxicitet, men det är inte helt klarlagt hur detta sker (Poland & Knutson, 1982). Bock & Köhle (2006) föreslår att den AhR-medierade toxiciteten kan bero på nedreglering av fysiologiska funktioner till följd av långvarig och olämplig aktivering. Till exempel finns det fakta som tyder på att AhR är inblandad i organogenesen, huddifferentiering och immunsystemets utveckling, vilket skulle kunna förklara en del av de effekter som har setts vid överdriven aktivering (eg TCDD) av AhR, samt vid avsaknad av receptorn hos till exempel genmodifierade möss (Bock & Köhle, 2006). Dock är det ännu mycket som är oklart kring hur Ah-receptorn medierar toxiska effekter och fysiologiska funktioner.

Zebrafiskceller

Användandet av fisk inom ekotoxikologin hjälper oss att förstå hur toxiner kan påverka akvatiska ekosystem, men ger även indikationer om hur andra ryggradsdjur, inklusive människa, kan förväntas påverkas. Zebrafisk (*Danio rerio*) har länge använts inom forskningen tack vare flera fördelar: de är små, förökar sig och utvecklas snabbt, har transparenta embryon, och mycket kunskap samlats in om dem och dess utveckling (Hill *et al.*, 2005). Zebrafiskens genom är nu helt kartlagt och har dessutom relativt mycket likheter med människor (Howe *et al.*, 2013).

Att zebrafiskar är känsliga för TCDD har bland annat visats i en studie av Elonen *et al.* (1998) där äggen exponerades för TCDD i olika koncentrationer och tid. Som mest utsattes zebrafiskäggen för 4390 pg TCDD per gram ägg i 250 minuter. I dessa försök minskade andelen av äggen som kläcktes till 92 % jämfört med 98 % i kontrollgruppen. Överlevnadsandelen efter kläckning var endast 6 % i den högst exponerade gruppen, mot 84 % i kontrollgruppen. Dessutom sågs tecken på TCDD-toxicitet i form av ödem, blödningar och missbildningar på huvud och hals. Av de 7 fiskarter som ingick i studien var zebrafisk minst känslig med ett LC50-värde ("lethal concentration" för 50 % av äggen) på ca 2500 pg/g TCDD/ägg.

I vårt försök användes zebrafiskceller från lever (ZFL) och fibroblaster (ZF4). En jämförande studie mellan ZFL-celler och primära hepatocyter från zebrafisk visade att cellinjen hade lägre sensitivitet för exogena ligander, och därmed minskad receptormedierad genaktivering, än hos de primära cellerna. Detta tycks vara fallet för de flesta cellinjer. Bortsett från detta fungerar försvarsmekanismerna mot xenobiotika i stort sett likadant, vilket gör ZFL-celler användbara inom toxikologin (Eidea *et al.*, 2014).

MATERIAL OCH METODER

Cellodling

Till försöken i studien användes leverceller och fibroblastceller från zebrafisk – ZFL- respektive ZF4-celler. Som medium till ZFL användes en blandning med 50 % Leibovitz's L-15 medium powder (Sigma-Aldrich), 35 % DMEM high glucose (Gibco) och 15 % Ham's F12 nutrient mix (Gibco), med tillsats av 15 mM HEPES (Gibco), 3 g/L natriumbikarbonat, 10 µg/mL bovine insulin (Sigma-Aldrich), 50 ng/mL mouse EGF (Sigma-Aldrich) och 5 % fetal bovine serum (Gibco). ZFL-cellerna odlades i T75-flaskor och inkuberades i 26-28°C med 0 % CO₂. Till ZF4-cellerna användes DMEM-F12 (ATCC) med tillsats av 10 % fetal bovine serum, 1 % penicillin-streptomycin 100 U/ml och 2,5 mM L-glutamin. De inkuberades i 26-28°C med 5 % CO₂. Cellerna passerades minst var 7:e dag, och tvättades då med PBS (Medicago). ZFL-celler lossades med 0,25 % Trypsin EDTA (Sigma-Aldrich) och ZF4-celler med 0,25 % Trypsin (Sigma-Aldrich).

Kemikalier

TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) löst i dimetylsulfoxid (DMSO) späddes till 9 olika stamlösningar med följande koncentrationer i µM: 31,1, 15, 5, 1,5, 0,5, 0,17, 0,06, 0,02 och 0,006. Dessa användes sedan för att blanda till valda koncentrationer som cellerna exponerades för. Ren DMSO användes som negativ kontroll och tillsattes då i samma koncentration som vid övriga behandlingar. Samma sak gjordes med benzo(a)pyrene och B-naftoflavone när dessa användes.

Luciferase reporter assay

För att mäta aktiveringen av AhR hos cellerna användes Dual Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Cellerna transfekterades med en plasmid innehållande en AhR-responsiv promotor samt en luciferasgen som fungerar som reporter – aktivering av AhR leder till produktion av luciferas (firefly) som kan avläsas. Samtidigt transfekterades cellerna med en annan luciferasplasmid (renilla) som uttrycks konstant och fungerar som en baslinje. Reporteraktiviteten kan sedan normaliseras mot kontrollen för att minimera variabilitet i mätvärdena som orsakas av varierande transfektionseffekt.

ZFL/ZF4-celler såddes ut i 96-brunnsplattor med 25 000 (ZFL) eller 12 500 (ZF4) celler i vardera brunn (förutom vid försöket då olika densiteter testades), 100 µL medium/brunn och inkuberades i 24 h. Därefter transfekterades cellerna: till varje brunn tillsattes AhR-responsiv pGud-Luc, Renilla, transfektionsreagens (1 µg/µL) med ett ratio på ca 1:2 mellan DNA och transfektionsreagens. Till ZFL användes X-tremeGENE HP (XHP) som transfektionsreagens och till ZF4 användes FuGENE® HD (FHD). Initialt användes 9 ng pGud-Luc och 3 ng renilla, men senare testades olika förhållanden mellan plasmiderna varefter ratio 9:1 användes. Efter transfektionen inkuberades cellerna i 24 h. Dagen efter behandlades cellerna med vald kemikalie, löst i DMSO, i olika koncentrationer, alternativt bara DMSO som negativ kontroll. Efter ytterligare 24 h inkubering lyserades cellerna med Passive Lysis Buffer och reporteraktiviteten mättes med Infinite M1000 microplate reader (Tecan) enligt tillverkarens instruktioner.

Cellviabilitet

Då cellerna behandlades med toxiska kemikalier (även DMSO är toxiskt i tillräckligt höga koncentrationer) gjordes parallella mätningar av cellviabiliteten för att kunna relatera resultaten till detta. Syftet med detta projekt var att studera en specifik toxicitetsmekanism (aktivering av AhR). Det är viktigt att sådana försök utförs under förhållande då cellerna inte utsätts för generell celltoxicitet, då detta kan påverka resultaten. ZFL- och ZF4-celler såddes ut i 96-brunnsplattor och behandlades med TCDD + DMSO på samma sätt och i samma koncentrationer som plattorna som transfekterades och inkuberades därefter i 24 h. För att mäta cellviabiliteten användes CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega). Reagenset MTS tetrazolium tillsätts till varje brunn varefter det metaboliseras av levande celler och bildar produkten formazan som sedan kan mätas. För avläsning av absorbansen användes Wallac Victor2 1420 microplate reader (PerkinElmer).

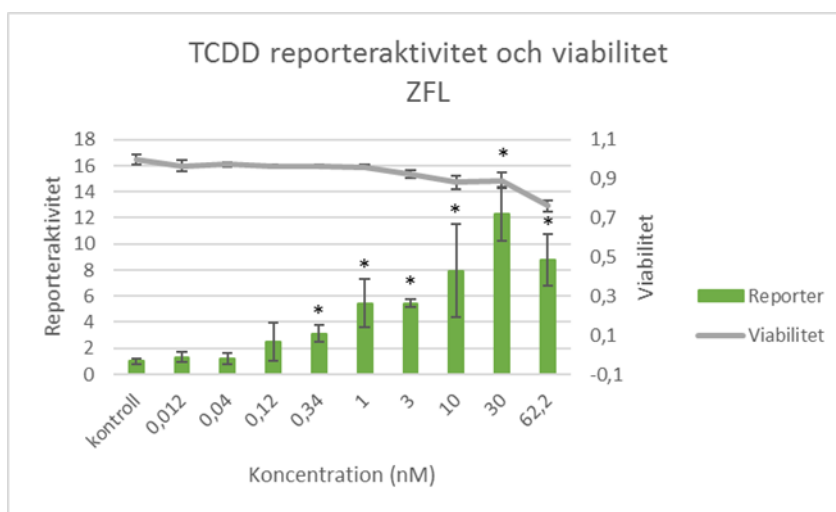
Statistisk analys

För varje försök, både cellviabilitet och luciferasreporteraktivitet, normaliserades värdena mot den negativa kontrollen för att få fram relativa värden. Medelvärdena av dessa presenterades sedan som stapeldiagram och linjediagram. Även standardavvikelse räknades ut och inkluderades i diagramen. För reporteraktiviteten användes t-test för att beräkna statistisk signifikans. Vid ett erhållet p-värde under 0,05 anses skillnaden mot kontrollen vara signifikant och markeras med en stjärna i grafen. Som signifikant sänkning av viabiliteten räknas mindre än 80 % av värdet i kontrollgruppen, det vill säga 0,8 i grafen. För beräkningar och sammanställning av grafer användes Microsoft Excel.

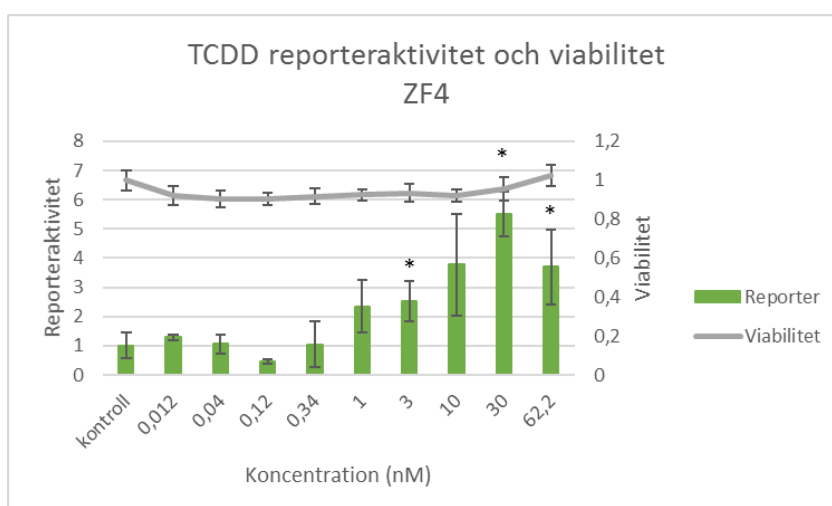
RESULTAT

TCDD – reporteraktivitet och viabilitet

Både ZFL- och ZF4-celler transfekterades och behandlades med TCDD i olika koncentrationer som ses i figurerna 1A & B. Resultaten visar att TCDD ger en dosberoende aktivering av AhR-receptorn (reporteraktivitet) hos både ZFL och ZF4. Hos ZFL ses signifikant effekt från 0,34 nM TCDD och uppåt. Där ses även en minskad viabilitet vid den högsta koncentrationen (mindre än 0,8), vilket kan förklara den minskade reporteraktiviteten i samma behandlingsgrupp, då en del av cellerna har dött innan avläsningen. ZF4 var inte lika känslig som ZFL i det här försöket, endast koncentrationerna 3, 30 och 62,2 nM gav signifikant effekt. Ingen signifikant minskad cellviabilitet kunde heller påvisas. ZFL hade dessutom betydligt högre fold induction i det här försöket, som mest ca 12 gånger kontrollen jämfört med ca 5,5 hos ZF4.



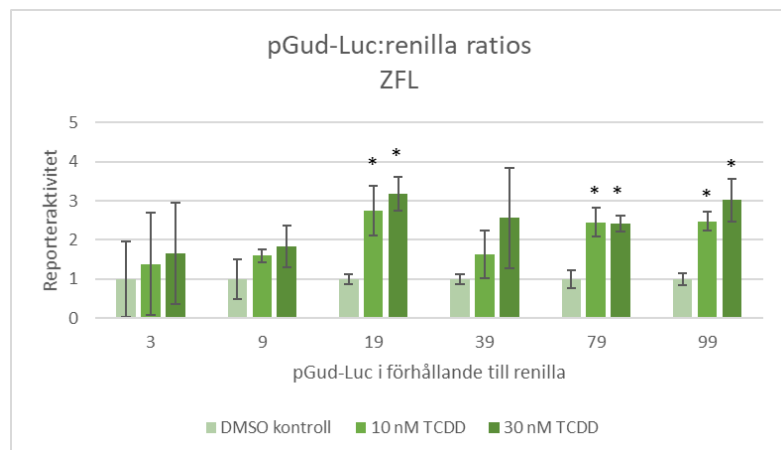
Figur 1A: TCDD reporteraktivitet och viabilitet ZFL.



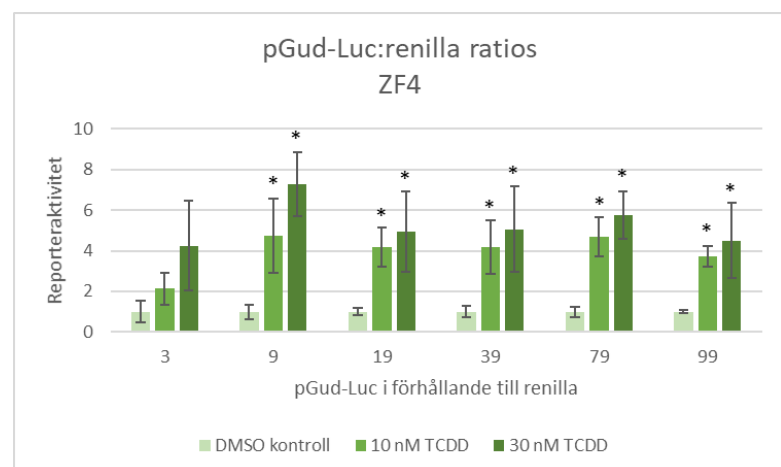
Figur 1B: TCDD reporteraktivitet och viabilitet ZF4.

Plasmid-ratios

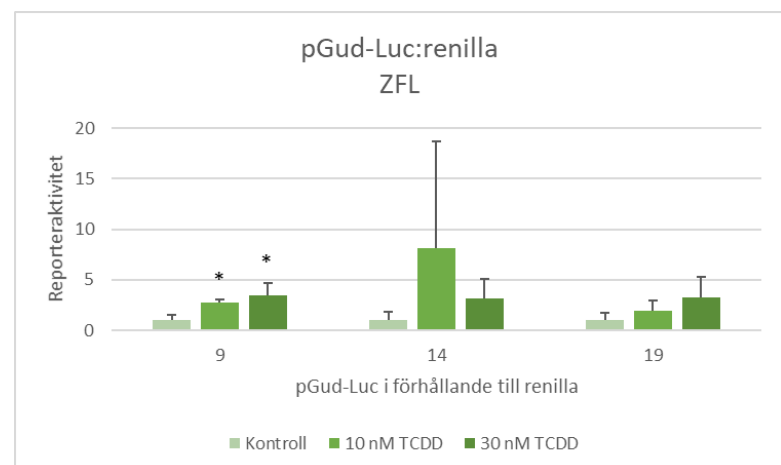
För att optimera metoden undersöktes hur olika förhållanden mellan de två plasmiderna som användes påverkade transfektionseffektiviteten och därmed slutresultatet. pGud-Luc användes i 3, 9, 19, 39, 79 och 99 delar till 1 del renilla (figur 2A & B). Försöket upprepades sedan med förhållandena 9:1, 14:1 och 19:1 (figur 2C & D). Resultatet för ratio 14:1 i 10 nM TCDD hos ZFL (fig. 2C) tolkas som en outlier, troligtvis på grund av något misstag i utförandet. Cellerna behandlades 24 h efter transfektion med 10 eller 30 nM TCDD samt negativ kontroll med enbart DMSO. I efterkommande försök valdes ratio 9:1, istället för 3:1 som användes dessförinnan. Vi gjorde även om de första experimenten med ratio 9:1 istället, för att kunna jämföra resultaten med varandra. Viabiliteten uppmättes i parallella försök, se figur 2E & F. En liten minskning av cellviabiliteten ses men är inte statistiskt signifikant hos varken ZFL eller ZF4.



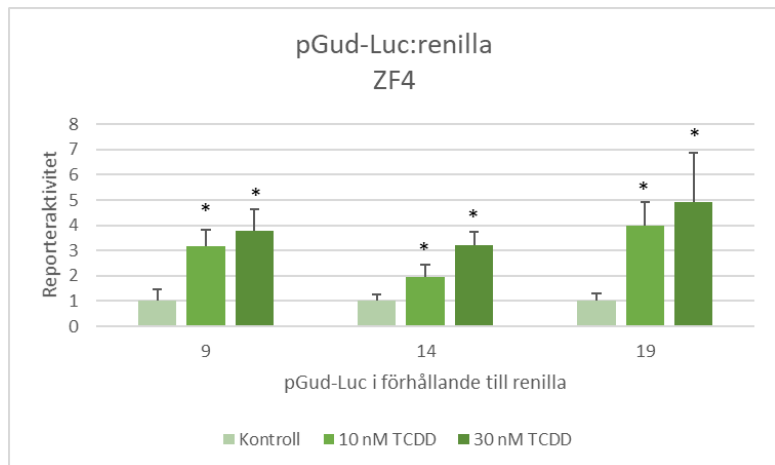
Figur 2A: pGud-Luc:renilla ratios, ZFL.



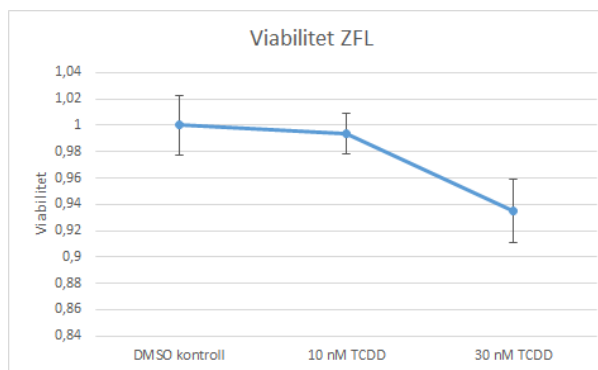
Figur 2B: pGud-Luc:renilla ratios, ZF4.



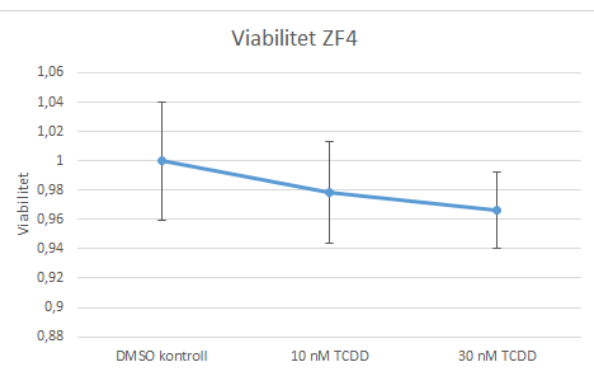
Figur 2C: pGud-Luc:renilla, ZFL.



Figur 2D: pGud-Luc:renilla, ZF4.



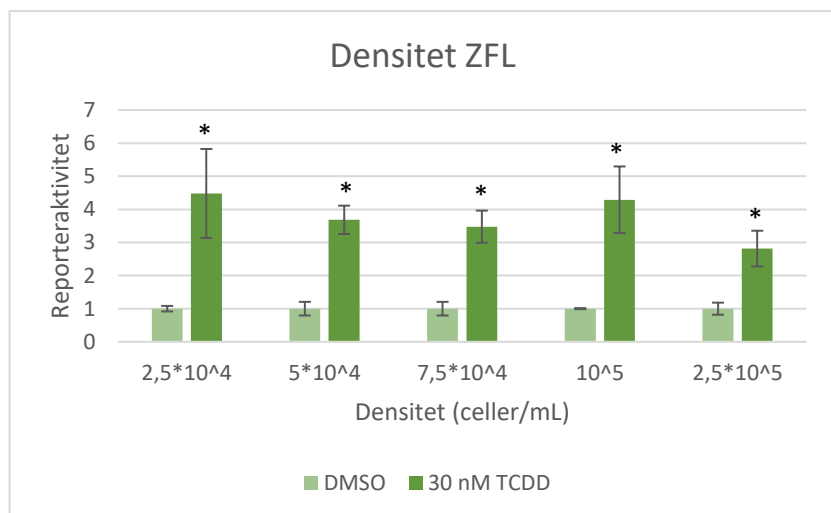
Figur 2E: Viabilitet ZFL.



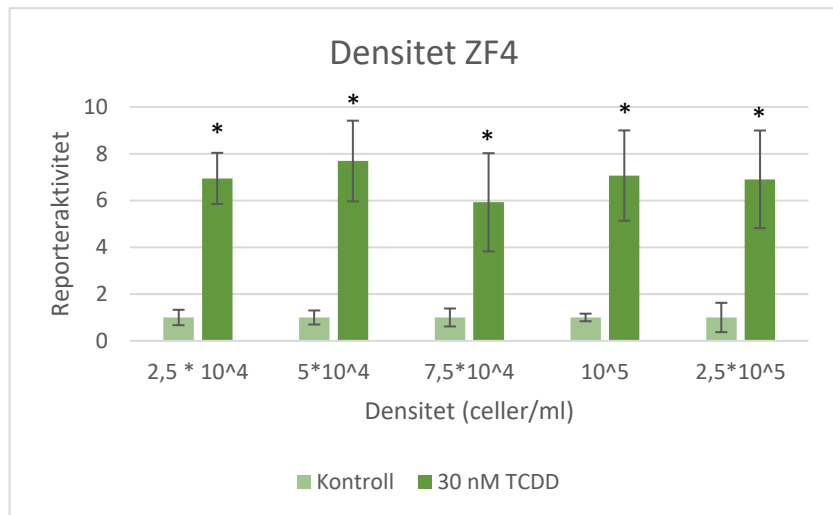
Figur 2F: Viabilitet ZF4.

Celldensitet

Som ytterligare ett försök att förfinas testades om olika densiteter av celler i brunnarna hade någon effekt på slutresultatet. Som ses i figur 3 A & B föreligger en liten variation, men då skillnaderna inte var så stora togs beslutet att fortsätta med samma densiteter i efterföljande försök.



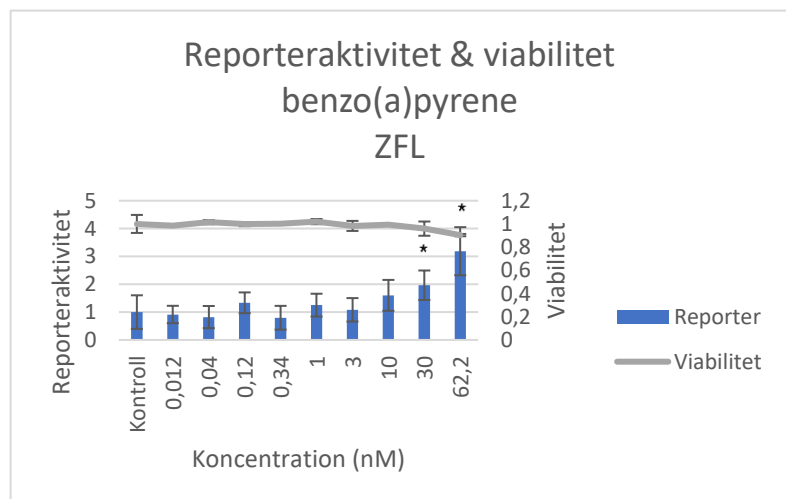
Figur 3A: Densitet ZFL.



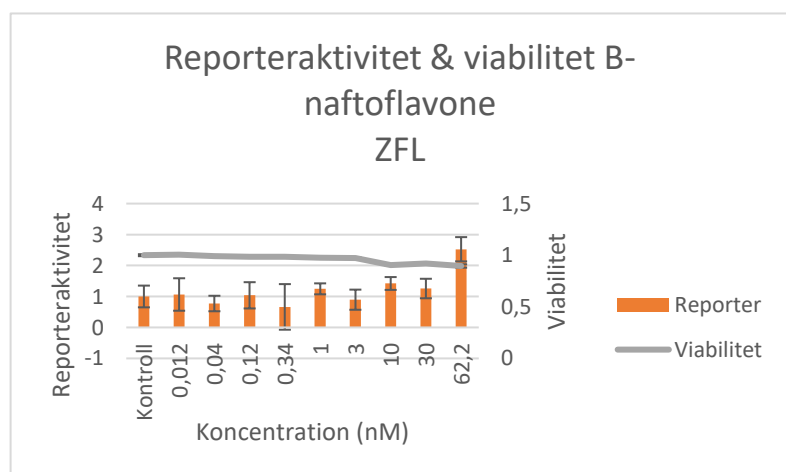
Figur 3B: Densitet ZF4.

Benzo(a)pyrene och B-naftoflavone

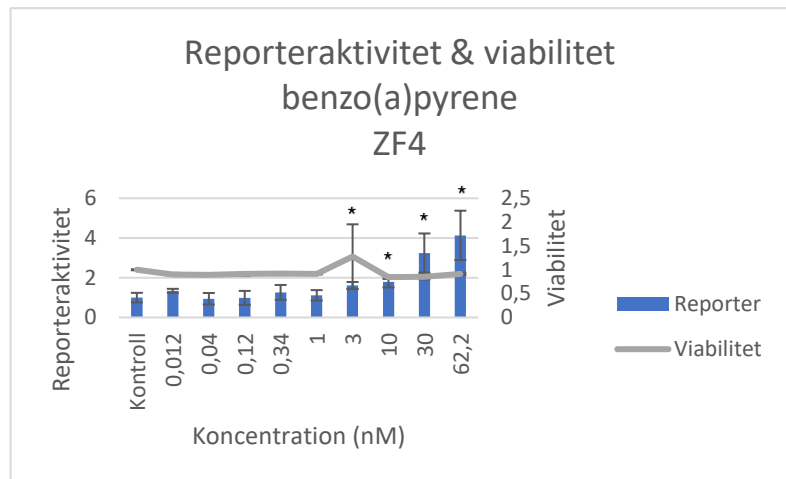
För att testa om AhR-aktiveringen/reporteraktiviteten kunde förbättras testades ytterligare två kemikalier, som är kända ligander till Ah-receptorn, benzo(a)pyrene och B-naftoflavone. Som bild 4A och C visar gav benzo(a)pyrene ett dosberoende svar ungefär likvärdigt TCDD hos båda cellinjerna. B-naftoflavone däremot (figur 4 B & D) tycks inte aktivera AhR i varken ZFL eller kontrollen ses. Cellviabiliteten är inte påverkad för någon av substanserna hos endera cellinjen. Då B-naftoflavone inte verkade särskilt lovande valde vi att inte gå vidare med det i kommande experiment eftersom både TCDD och B(a)P var bättre kandidater.



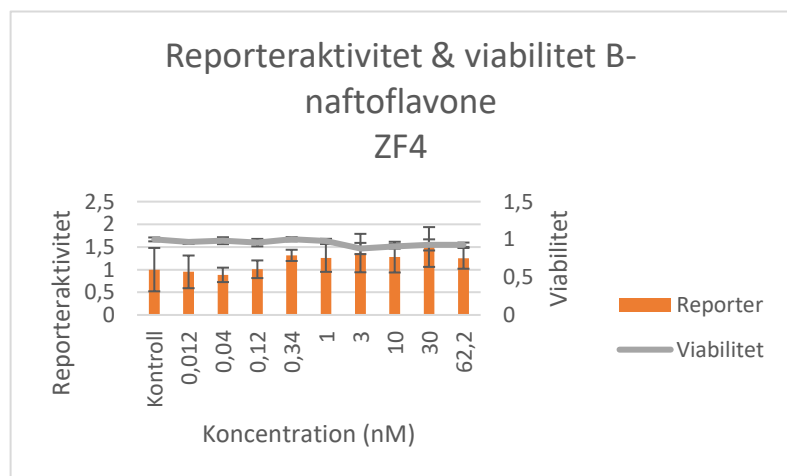
Figur 4A: reporteraktivitet & viabilitet benzo(a)pyrene, ZFL.



Figur 4B: reporteraktivitet & viabilitet B-naftoflavone, ZFL.



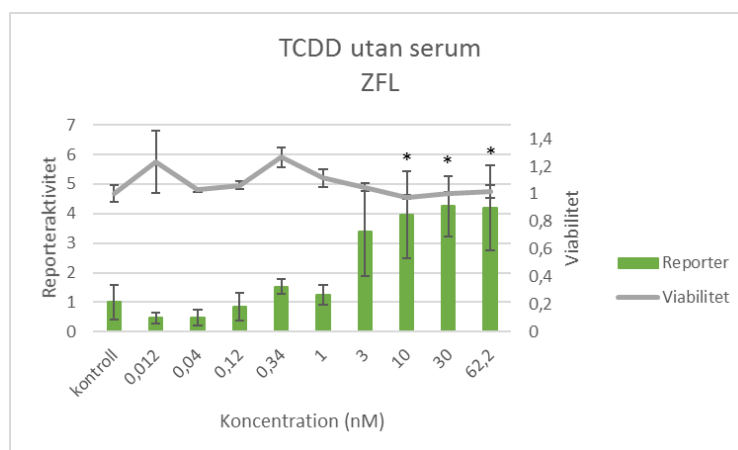
Figur 4C: Reporteraktivitet & viabilitet benzo(a)pyrene, ZF4.



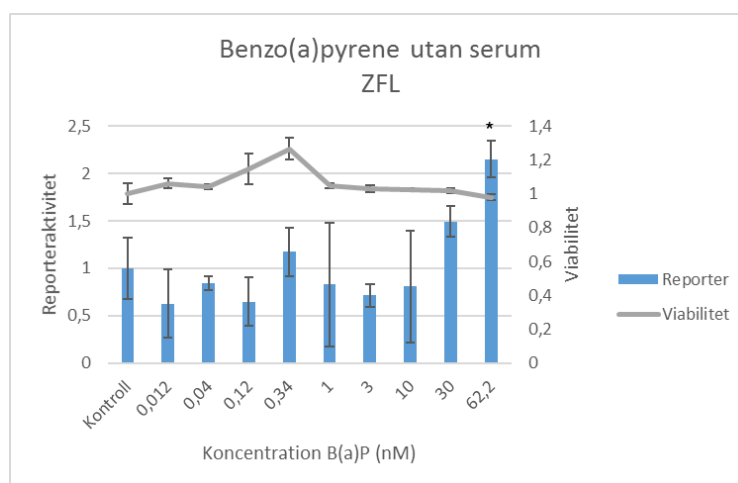
Figur 4D: Reporteraktivitet & viabilitet B-naftoflavone, ZF4.

Serumfritt medium

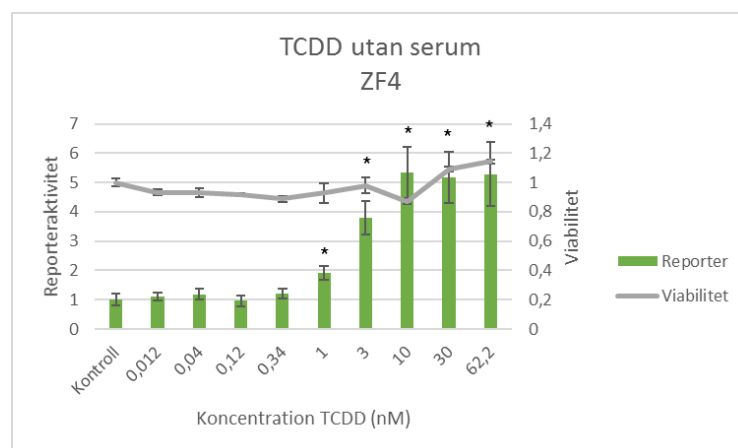
Då det är känt sedan tidigare att serum som tillsätts i cellernas tillväxtmedium i varierande grad kan binda kemiska substanser och därmed göra dem otillgängliga för cellerna som ska exponeras, gjordes ett försök att använda serumfritt medium under själva exponeringen fram till avläsning 24 h senare (figur 5A-D). Om man jämför med motsvarande försök med respektive cellinje och kemikalie, det vill säga figur 1 A och B samt 4 A och C, ser man att det inte blev några stora skillnader. Den enda gruppen som visade ökad känslighet utan serum var ZF4 behandlad med TCDD (fig. 5C) som jämfört med figur 1B visade signifikant effekt ända ner till 1 nM. När försöket upprepades sågs emellertid inte samma förbättring.



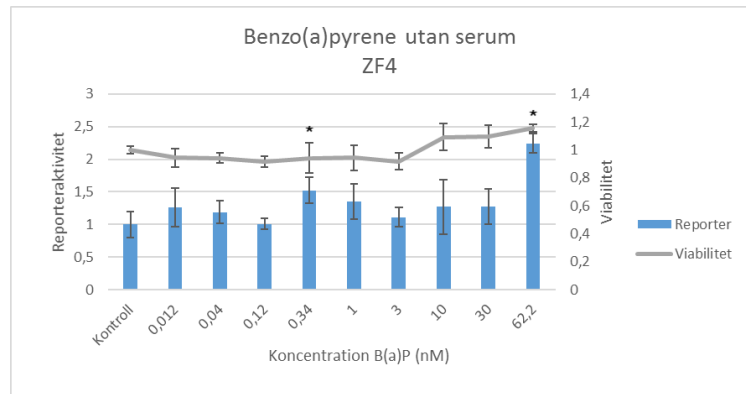
Figur 5A: TCDD utan serum, ZFL.



Figur 5B: benzo(a)pyrene utan serum, ZFL.



Figur 5C: TCDD utan serum, ZF4.



Figur 5D: benzo(a)pyrene utan serum, ZF4.

DISKUSSION

Det finns publicerade försök med liknande metoder sedan tidigare. Yang *et al.* (2016) använde ZFL-celler med AhR-beroende luciferas-reportersystem likt vårt försök, men exponerade med 2, 2', 4, 4', 5-pentabromodiphenyleter (BDE-99) och 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyleter (BDE-47), varav endast BDE-99 gav upphov till signifikant effekt. Tanguay *et al.* (1999) exponerade ZFL-celler med TCDD och mätte induktionen av zfAhR2 och CYP1A som visades öka dosberoende upp till 100 nM TCDD. Dock har jag inte funnit någon studie med precis samma metod och kemikalier som vi har använt.

Syftet med vårt projekt var att utforma en ny metod för att mäta AhR-aktivering i zebrafiskceller. Initialt var även tanken att metoden skulle testas med ett antal olika kemikalier. Under projektets gång valde vi dock istället att fokusera på att utveckla och förfinas metoden för att se om det gick att öka känsligheten, då tiden var begränsad.

Vi kan konstatera att AhR aktiveras i både ZFL- och ZF4-celler vid exponering med TCDD och benzo(a)pyrene och ger en dosberoende effekt. Som mest sågs en fold induction på ca 12 gånger kontrollvärdet för ZFL och ca 8 för ZF4 i de högsta koncentrationerna TCDD som användes, 30 och 62,2 nM. Dock sågs en ganska stor variation mellan försöken, ibland blev reporteraktiviteten i samma koncentrationer endast runt 3. Den lägsta koncentrationen som gav signifikant ökad reporteraktivitet var 1 nM hos ZF4 och 0,34 nM hos ZFL. Cellviabiliteten blev inte signifikant påverkad i de koncentrationer som användes, förutom en enstaka gång i högsta koncentrationen, 62,2 nM TCDD (fig 1A).

För att metoden ska vara användbar i praktiken behöver den vara känslig. Då kemikalierna som användes i experimenten är mycket potenta bör de ge en AhR-aktivering, vilken uppmäts som luminiscens/reporteraktivitet, redan i låga koncentrationer. Om dessa kemikalier ger en induktion först vid höga koncentrationer kan man inte förvänta sig att metoden ska kunna detektera mindre potenta kemikalier eller endast i mycket hög koncentration, vilket gör den mindre användbar. Därför gjordes försök där några delar i utförandet varierades, för att hitta det mest optimala tillvägagångssättet. Det inkluderar olika förhållanden mellan de två plasmiderna som användes, olika celldensiteter i brunnarna, två alternativa kemikalier till TCDD och användande av serumfritt medium.

Cellerna transfekterades under varje försök med två plasmider – pGud-Luc som är känslig för AhR och vid aktivering genererar luciferas, samt renilla som fungerar som en konstant baslinje att kontrollera mot. Initialt användes pGud-Luc i förhållandet 3:1 till renilla, men efter försöket valdes 9:1 att användas i fortsättningen då det såg mest lovande ut, även om skillnaderna inte var så stora. Transfektionsreagensen som användes, XHP respektive FHD, valdes baserat på försök av Lungu-Mitea *et al.* (opublicerad data) som visade att XHP gav bäst transfektionseffektivitet hos ZFL-celler, och FHD fungerade bäst för ZF4-celler utifrån de 12 alternativ som testades.

Densiteten av celler som sås ut i brunnarna kan också ha en betydelse för transfektionseffektiviteten. Dock var skillnaderna i vårt experiment inte så stora och tillräckligt tydliga för att vi skulle anse det meningsfullt att ändra celldensitet. För att med större säkerhet kunna uttala sig om vilken densitet som är bäst lämpad skulle försöket behöva upprepas, men det gjordes inte på grund av tidsbegränsningen.

Även om TCDD är en känd potent ligand till AhR kan receptoraktiveringen variera mellan olika cellinjer. Därför valde vi att testa med ytterligare två kemikalier, benzo(a)pyrene och B-naftoflavone, för att se om de skulle ge en högre aktivering av AhR hos ZFL och ZF4. Tyvärr var så inte fallet, utan benzo(a)pyrene gav ett liknande svar, medan B-naftoflavone inte alls tycktes ge någon aktivering av AhR i någon av cellinjerna.

Serum som tillsätts till cellmediet har visat sig nödvändigt för att cellerna ska överleva och tillväxa (Collodi *et al.*, 1992), även om det inte är riktigt klart vilka komponenter i serumet som är essentiella. Men man har också sett att det i varierande grad kan binda kemikalier och därmed minska den fria koncentrationen som cellerna utsätts för. I försök av Hestermann *et al.* (2000) blev EC50 vid TCDD-behandling av PLHC-1-celler 20 gånger högre vid användning av medium med 10 % kalvserum jämfört med serumfritt medium. Även PCB visade sig binda till serumet då EROD-induktion skedde vid lägre koncentrationer när serumfritt medium användes. Därför ville vi testa om användandet av serumfritt medium även i vår metod gav en ökning av reporteraktiviteten och/eller induktion vid lägre koncentrationer. För att inte påverka cellernas viabilitet och tillväxt mer än nödvändigt användes serumberikat medium fram till exponeringen, då mediet byttes. Cellerna hade alltså det serumfria mediet endast i 24 h, och viabilitetsmätningarna som gjordes parallellt visade ingen signifikant minskad cellviabilitet. Om man jämför resultaten utan serum med motsvarande försök med serum kan vi konstatera följande: hos ZFL-cellerna sågs inte någon förbättrad effekt utan serum, varken vid TCDD- eller B(a)P-exponering. En liten förbättring sågs hos ZF4 med TCDD, men när försöket upprepades sågs ingen skillnad, utan det tycks ha varit en tillfällighet. Utifrån resultaten vi fick verkar det alltså som att 5 % (ZFL) respektive 10 % (ZF4) fetalt bovint serum i mediet inte binder TCDD och benzo(a)pyrene i så hög grad att det ger en påtaglig minskning av tillgängligheten och upptaget till cellerna i de koncentrationer som användes här.

Två olika cellinjer från zebrafisk användes i försöket; ZFL som härstammar från levern och ZF4 som är celler av fibroblasttyp. Då levern är det organ i kroppen som huvudsakligen tar hand om och metaboliserar toxiner, hade man kunnat anta att dessa celler i högre grad skulle vara benägna att ta upp kemikalierna som tillfördes och vara känsligare för AhR-aktivering än ZF4, även om AhR har hittats i de flesta typer av vävnader (Ema *et al.*, 1992; Carver *et al.*, 1994). Detta bekräftas i någon mån av denna studie, då ZFL hade lite högre reporteraktivitet

och visade effekt i lite lägre koncentrationer. Dock var skillnaderna inte jättestora – ZF4 fungerade också bra i våra försök.

Förutom att testa toxiciteten hos enskilda kemikalier, kan man tänka sig att metoden skulle kunna användas för tester av vattenprover från miljön. Frågan är då om metodens känslighet är tillräckligt hög för att kunna detektera de halter av kemikalier som kan förekomma i sådana prover. Vid undersökningar av avloppsvatten har man uppmätt halter av TCDD-ekvivalenter på upp till 0,36 nM, men även under 1 pM och ett spann däremellan (Ma *et al.*, 2005; Mahjoub *et al.*, 2009; Dagnino *et al.*, 2010; Macova *et al.*, 2010; Reungoat *et al.*, 2010; Mahjoub *et al.*, 2011). Således skulle metoden kunna detektera TCDD-ekvivalenter i kontaminerade miljöprover om koncentrationen är tillräckligt hög, men skulle inte ge utslag för låga koncentrationer. Den skulle alltså kunna vara användbar även i den typen av miljötester, om man är medveten om dess begränsningar.

Sammanfattningsvis konstaterar vi att metoden fungerade ungefär som väntat. TCDD och B(a)P gav en dosberoende aktivering av AhR som kunde mätas med hjälp av luciferas som producerades i proportion till aktiveringen, tack vare de AhR-känsliga plasmiderna som sattes in i cellerna. Vi har även fått fram värden på hur kraftig AhR-aktivering som kan förväntas i dessa celltyper med ovan nämnda kemikalier och i vilka koncentrationer den sker. Cellviabiliteten påverkas inte signifikant i de koncentrationer som användes, utom eventuellt i 62,2 nM TCDD. Vi har kommit fram till ett ratio mellan de två olika plasmiderna som fungerar bra, 9:1 pGud-Luc:renilla. Samt att användandet av 5-10 % fetalt bovint serum i mediet inte har en signifikant effekt på resultatet i den här metoden. Vi har även sett att båda celltyperna som användes, ZFL och ZF4, fungerade bra, men ZFL var lite känsligare och troligtvis bättre lämpad att använda till liknande försök i fortsättningen. Förhoppningsvis kommer det i framtiden att bli en godkänd metod för att ersätta vissa djurförsök vid testning av kemikaliers toxicitet. Man kan även tänka sig att använda den för testning av vattenprover, bara man är medveten om att endast koncentrationer över 0,34 nM TCDD sannolikt detekteras.

TACK

Tack till Johan Lundqvist och Sebastian Lungu-Mitea, som har guidat mig genom projektet och lärt mig mycket nytt inom området. Tack även till Anna Rosenmai och Geeta Mandava för stöd och hjälp i labbet, och till Agneta Oskarsson för bra kritik och kommentarer på den skriftliga rapporten.

REFERENSER

- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nicols, J.W., Russom, C.L., Schmeider, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E. & Villeneuve, D.L. (2010). Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29:730–741.
- Bock, K.W. & Köhle, C. (2006). Ah receptor: Dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochemical Pharmacology*, 72:393–404.
- Carver, L.A., Hogenesch, J.B. & Bradfield, C.A. (1994). Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 22: 3038–3044.
<https://doi.org/10.1093/nar/22.15.3038>
- Castaño, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L.E.J., Mothersill, C., Pärt, P., Repetto, G., Riego, Sintes, J., Rufli, H., Smith, R., Wood, C. & Segner, H. (2003). The use of fish cells in ecotoxicology. *ATLA*, 31:317–351.
- Collodi, P., Kame, Y., Ernst, T., Miranda, C., Buhler, D.R. & Barnes, D.W. (1992). Culture of cells from zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo and adult tissues. *Cell Biology and Toxicology*, 8:43–61. <https://doi.org/10.1007/BF00119294>
- Dagnino, S., Gomez, E., Picot, B., Cavaillès, V., Casellas, C., Balaguer, P. & Fenet, H. (2010). Estrogenic and AhR activities in dissolved phase and suspended solids from wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*, 408:2608-2615.
- Eidea, M., Rustenb, M., Maleb, R., Midtbø Jensen, K.H. & Goksøyraa, A. (2014). A characterization of the ZFL cell line and primary hepatocytes as in vitro liver cell models for the zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 147:7–17.
- Elonen, G.E., Spehar, R.L., Holcombe, G.W., Johnson, R.D., Fernandez, J.D., Erickson, R.J., Tietge, J.E. & Cook, P.M. (1998). Comparative toxicology of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to seven freshwater fish species during early life-stage development. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17:472–483.
- Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotohz, O., Funaes, Y. & Fujii-Kuriyama, Y. (1992). cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184:246-253.
- Europaparlamentets och rådets direktiv om skydd av djur som används för vetenskapliga ändamål (2010/63/EU). Bryssel. (L 276/33).
- Europeiska kommissionen (2013). *RAPPORT FRÅN KOMMISSIONEN TILL RÅDET OCH EUROPAPARLAMENTET*; Sjunde rapporten om statistik över antalet djur som används för försök och andra vetenskapliga ändamål i Europeiska unionens medlemsstater. Bryssel den 5.12.2013, COM(2013) 859.
- Europeiska kommissionen (2014). *EURL ECVAM Strategy to replace, reduce and refine of fish in aquatic toxicity and bioaccumulation testing*. Luxembourg: Publications Office of the European Union. (Report EUR 26973 EN) doi:10.2788/084219
- Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M. & Gonzaleza, F.J. (1996). Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Induced Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 140:173-179.

- Hankinson, O. (1995). The aryl hydrocarbon receptor complex. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 35:307-340.
- Hestermann, E.V., Stegeman, J.J. & Hahn, M.E. (2000). Serum alters the uptake and relative potencies of halogenated aromatic hydrocarbons in cell culture bioassays. *Toxicological Sciences*, 53:316–325.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W. & Peterson, R.E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences*, 86:6–19.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi110>
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J.C., Koch, R., Rauch, G-J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L.T., Guerra-Assunção, J.A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J-H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliott, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthavadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Babbage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J.D., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C.M., Ersan-Ürün, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberländer, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osoegawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S.C., Carter, N.P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S.M.J., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R.H.A., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P.J., Zon, L.J., Postlethwait, J.H., Nüsslein-Volhard, C., Hubbard, T.J.P., Roest Crollius, H., Rogers, J. & Stemple, D.L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496:498-503. doi:10.1038/nature12111
- Ma, M., Li, J. & Wang, Z. (2005). Assessing the detoxication efficiencies of wastewater treatment processes using a battery of bioassays/biomarkers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49:480-487.
- Macova, M., Escher, B.I., Reungoat, J., Carswell, S., Chue, K.L., Keller, J. & Mueller, J.F. (2010). Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced wastewater treatment with ozonation and activated carbon filtration. *Water Research*, 44:477-492.
- Mahjoub, O., Leclercq, M., Bachelot, M., Casellas, C., Escande, A., Balaguer, P., Bahri, A., Gomez, E. & Fenet, H. (2009). Estrogen, aryl hydrocarbon and pregnane X receptors activities in reclaimed water and irrigated soils in Oued Souhil area (Nabeul, Tunisia). *Desalination*, 246:425-434.
- Mahjoub, O., Escande, A., Rosain, D., Casellas, C., Gomez, E. & Fenet, H. (2011). Estrogen-like and dioxin-like organic contaminants in reclaimed wastewater: transfer to irrigated soil and groundwater. *Water Science and Technology*, 63:1657-1662.

- Nikinmaa, M. (2014). *An introduction to aquatic toxicology*. 1:a upplagan. Academic press.
- OECD Environment Directorate (2012). *FISH TOXICITY TESTING FRAMEWORK – Series on Testing and Assessment*. Paris. (OECD Environment, Health and Safety Publications; Series on Testing and Assessment, No. 171)
- Peterson, R.E., Theobald, H.M. & Kimmel, G.L. (1993). Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *Critical Review of Toxicology*, 23:283-335. <http://dx.doi.org/10.3109/10408449309105013>
- Poland, A. & Knutson, J.C. (1982). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 22:511-554.
- Prasch, A.L., Teraoka, H., Carney, S.A., Dong, W., Hiraga, T., Stegeman, J.J., Heideman, W. & Peterson, R.E. (2003). Aryl hydrocarbon receptor 2 mediates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin developmental toxicity in zebrafish. *Toxicological Sciences*, 76:138–150. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg202>
- Reungoat, J., Macova, M., Escher, B.I., Carswell, S., Mueller, J.F. & Keller, J. (2010). Removal of micropollutants and reduction of biological activity in a full scale reclamation plant using ozonation and activated carbon filtration. *Water Research*, 44:625-637.
- Schirmer, K. (2006). Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology*, 224:163-183.
- Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S.S., Guengerich, F.P. & Sutler, T.R. (1996). Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 IBI. *Cancer Research*, 56:2979-2984.
- Tanguay, R.L., Abnet, C.C., Heideman, W. & Peterson, R.E. (1999). Cloning and characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) aryl hydrocarbon receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1444:35-48. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(98\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(98)00252-8)
- Wolf, K. & Quimby, M.C. (1962). Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science* 135:1065-1066.
- Yang, J., Zhu, J. & Chan, K.M. (2016). BDE-99, but not BDE-47, is a transient aryl hydrocarbon receptor agonist in zebrafish liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 305:203–215. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.06.023>